УДК 619:576.8.097.3.636.4

**И.Ю. Ездакова**
*(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко)*

# ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТЕЛЬНЫХ КОРОВ

Одной из важнейших проблем ветеринарной науки продолжает оставаться проблема профилактики бесплодия и получение жизнеспособного молодняка. Успешное их решение основано на знании механизмов регуляции репродуктивной функции материнского организма при беременности. Иммунная система во время плодоношения, вместе с нервной и эндокринной системами определяет нормальное развитие плода и рождение здоровых телят. Несмотря на достижения ветеринарной науки в области иммунологии репродукции, многие аспекты этой важной проблемы изучены не в полной мере. Пока нет ответа на вопрос, каким образом иммунная система перестраивается, предотвращая иммунологический конфликт при беременности. Известно, что нормальная беременность характеризуется угнетением материнского клеточного иммунного ответа против эмбриона при наличии гуморального ответа на определенные антигены плода (1). Всестороннее изучение физиологического состояния стельных коров, в частности оценка показателей иммунного статуса, поможет найти пути своевременной коррекции естественной резистентности организма. В период стельности в организме коров возникает определенная супрессия иммунной системы. Если у здорового животного говорить об иммунодефицитном состоянии при беременности вряд ли возможно, то у коров с низкими показателями иммунного статуса в этот период может возрасти риск рождения нежизнеспособных телят. В связи с указанным, исследования количественной динамики параметров иммунной системы стельных коров представляют значительный интерес не только для понимания сложного комплекса взаимодействий между плацентой и иммунной системой, но и для разработки практических приемов коррекции воспроизводительной функции животных и получения здорового молодняка.

Цель исследования – количественная характеристика иммунокомпетентных клеток и уровня иммуноглобулинов в периферической крови стельных коров.

**Материалы и методы.** Для эксперимента по принципу аналогов были подобраны 2 группы по 10 коров (Молочный комплекс ЗАО «Кузнецовский» Московской области). Первая группа включала коров со сроком стельности 3-4 мес., вторая – не стельных коров. Началом беременности считали день последнего осеменения. Иммунологические исследования проводили двукратно с интервалом 2 месяца.

Из периферической крови выделяли лимфоциты методом центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 («Sigma») при 1000g в течение 45 мин.

Число В-лимфоцитов определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Для удаления экзогенных иммуноглобулинов 100 мкл взвеси мононуклеарных клеток ($0{,}5 \times 10^6$кл/мл) периферической крови крупного рогатого скота обрабатывали 1,0%-3,0%-ным раствором лимонной кислоты в течение минуты, затем трижды центрифугировали в фосфатном буфере pH 7,2 (PBS) при 110 g 5 мин. В качестве блокирующего раствора использовали 10%-15%-ный раствор сыворотки крови лошади в PBS. Инкубировали 60 мин. при комнатной температуре, отмывали клетки. Суспензию клеток помещали на предметное стекло, высушивали, фиксировали в растворе ацетона с метиловым спиртом (1:1) в течение 10 мин при 4° С. К фиксированным клеткам добавляли моноклональные антитела к IgM рогатого скота (1:100), полученные в лаборатории иммунологии ВИЭВ. Для контроля на предметные стекла вместо МКА вносили 1%-ный раствор БСА. Инкубировали в течение 60 мин. при комнатной температуре во влажной камере, отмывали PBS. Затем добавляли вторичные антитела, меченные FITC (НПЦ «МедБиоСпектр»), инкубировали в течение 30 мин. во влажной камере. Двукратно отмывали в PBS и просматривали под микроскопом (x600). В качестве иммерсионной среды использовали 50% раствор глицерина в PBS. Учитывали светящиеся клетки в течение 24 часов после постановки реакции.

Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли методом простой

радиальной иммунодиффузии по методу Манчини, используя антисыворотки к IgG и IgA, моноклональные антитела к IgM и стандартную сыворотку крови крупного рогатого скота с известным содержанием иммуноглобулинов.

Количество Ig определяли в мг/мл по калибровочной кривой, отражающей зависимость между логарифмом концентрации иммуноглобулинов в сыворотке и соответствующим диаметром кольца преципитации. Количество Т-лимфоцитов определяли методом спонтанного розеткообразования по стандартной методике.

Результаты обрабатывали статистически с использованием программы Excel для Windows.

**Результаты и обсуждение.** Продолжительность беременности у коров в зависимости от конкретных условий и индивидуальных особенностей (порода, подбор пар, генотип животного и др.) может колебаться от 240 до 311 дней. Известно, что в период стельности продуцируются вещества с иммуномодулирующей активностью. В первую очередь это гормоны беременности, влияющие на иммунную систему, ослабляя пролиферацию активированных лимфоцитов и вызывая анергию Т-клеток. Иммунная толерантность при физиологической беременности обусловливается активацией лимфоцитов со свойствами супрессоров и цитокинами с иммуносупрессивными свойствами. Беременность сопровождается уменьшением массы тимуса и числа Т-клеток, за счет снижения содержания Т-хелперов. Также в этот период выявлено увеличение функциональной активности фагоцитов (1).

В результате проведенных экспериментов показано, что у коров в период от 3-4 до 5-6 мес. стельности повышается как относительное (от 24,8% до 34,6%), так и абсолютное количество (от 0,9х$10^9$/л до 1,7х$10^9$/л) розеткообразующих клеток в периферической крови. Данная, но менее выраженная тенденция, наблюдалась и в контрольной группе. (табл. 1). Метод розеткообразования основан на том, что на поверхности большинства Т-лимфоцитов человека расположены CD2-антигены. По мнению Watt C.R. (1994) численность CD2-Т-лимфоцитов у крупного рогатого скота с возрастом практически не изменяется и составляет 30%.

Механизмы экспрессии CD2 молекул на Т-лимфоцитах животных до сих пор не совсем ясны. Вместе с тем в наших исследованиях на лабораторных животных (б/п мыши), количество розеткообразующих клеток коррелировало с числом CD2-лимфоцитов (2), определенных методом иммунофлуоресценции, на высоком уровне значимости ($p<0,01$) .

Известно, что молекула CD2 экспрессируется не только на Т-клетках, но и на NK-клетках. Супрессия специфического иммунного ответа матери компенсируется усилением естественного, врожденного иммунитета, в частности увеличивается количество натуральных киллеров (1). Поэтому повышение в периферической крови стельных коров количества розеткообразующих клеток в изучаемый период можно объяснить увеличением числа NK-клеток.

Для количественного определения В-клеток крупного рогатого скота, в основном, используются такие индикаторные частицы как ЕАС – эритроциты быка, сенсибилизированные комплементом, ЗС – гранулы зимозана, покрытые комплементом, М – эритроциты мыши, которые применяются для оценки числа В-лимфоцитов человека (Караулов А.В., 2002). Анализ литературных данных показывает, что показатели В-лимфоцитов в периферической крови крупного рогатого скота у разных авторов значительно отличаются. Так Tizard I.R. (1996) приводит в своей книге данные о 16,0–21,0%, а Pastoret P-P et al (1998) считают, что относительное содержание mIg+В-клеток колеблется от 30% до 60%, Донник И.М. и соавт. (2005) — 21,2–31,5%, Шахов А.Г. и соавт.(2006) – 17,7%. Различия результатов обусловлены, в основном, использованными методами определения, а также физиологическим состоянием животных.

По нашему мнению, для более точного определения уровня В-клеток, необходимы специфичные реагенты для каждого вида животных. С этой целью для оценки числа В-клеток использовали моноклональные антитела к IgM рогатого скота в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Зарегистрировано незначительное повышение относительного и абсолютного содержания В-лимфоцитов (от 26,8% до 29,2%), по-видимому, связанное с увеличением иммуноглобулинов в периферической крови стельных коров.

Системные изменения иммунитета при беременности, в первую очередь, зависят от продукции гормонов, а также от иммунорегуляторного действия плаценты. При десмохориальном типе плаценты, с увеличением срока стельности у коров, эпите-

Таблица 1

**Динамика иммунологических показателей у стельных и не стельных коров**

| Показатели | СК -1 | СК - 2 | Контроль - 1 | Контроль - 2 |
|---|---|---|---|---|
| Е-РОК<br>%<br>абс.(x10⁹/л) | <br>24,8±2,1<br>0,9±0,3 | <br>34,6±3,5<br>1,68±0,5 | <br>22,5±2,1<br>0,67±0,2 | <br>24,7±3,2<br>0,97±0,3 |
| В-лимфоциты<br>%<br>абс. | <br>26,8±4,5<br>1,0±0,2 | <br>29,2±1,9<br>1,5±0,3 | <br>25,3±2,6<br>0,97±0,5 | <br>26,2±2,0<br>1,0±0,7 |
| IgM мг/мл | 2,3±0,4 | 3,5±0,5 | 2,3±0,1 | 3,1±0,4 |
| IgG мг/мл | 21,6±1,0 | 26,0±1,6 | 19,7±2,2 | 20,7±3,3 |
| IgA мг/мл | 0,75±0,3 | 0,8±0,2 | 1,0±0,5 | 1,3±0,6 |

СК-1 – показатели коров со сроком стельности 3-4 мес., СК-2 – показатели коров со сроком стельности 5-6 мес. Контроль 1 и 2 – средние показатели не стельных коров с интервалом 2 мес.

Таблица 2

**Корреляция параметров иммунного статуса в сыворотке крови стельных коров.**

| Показатели | Стельные коровы (3-4 мес.) | Стельные коровы (5-6 мес.) | Контроль |
|---|---|---|---|
| Е-РОК/В-клетки | 0,64 | 0,84 | 0,5 |
| IgG/IgM | 0,27 | 0,73 | 0,3 |
| IgM/IgA | 0,25 | 0,56 | 0,4 |
| IgG/IgA | 0,3 | 0,71 | 0,47 |

Р<0,01 при сравнении показателей стельных коров

лий ворсин и крипт слущивается, сосудистая система плода отделена от сосудов матери только соединительной тканью, что сказывается на функционировании плацентарного барьера. Благодаря такому строению, плацента коров не пропускает через клеточные слои из крови матери молекулы иммуноглобулинов (Ig). Передача материнских Ig теленку происходит постнатально с молозивом. В траффике IgG из крови в молочную железу особая роль принадлежит Fcγ-рецепторам на поверхности эпителиальных клеток. Трансэпителиальный переход иммуноглобулинов G в молочную железу достигает максимума за 2-3 недели перед отелом.

Несмотря на то, что IgG в секрете молочной железы имеет, в основном, сывороточное происхождение, наряду с транссудацией имеет место и локальный синтез иммуноглобулинов. Это подтверждается присутствием в молочной железе IgA-, IgG-плазматических клеток (3).

Как видно из таблицы 1, в крови коров в период с 3-4 до 5-6 мес. стельности происходит увеличение уровня иммуноглобулинов G (с 21,6 мг/мл до 26,0 мг/мл), которые путем транссудации поступают в молочную железу, накапливаются там и постнатально с молозивом передаются теленку. Известно, что иммуноглобулины G1 являются доминирующим изотипом в молозиве коров (3).

Иммунная толерантность при беременности обусловлена продукцией блокирующих антител, вызывающих модуляцию иммунного ответа. Клеточные рецепторы для IgG – FcγR, экспрессируют макрофаги, НК-клетки, некоторые Т-клетки и нейтрофилы. Мономерный IgG связываясь с Fc-рецепторами иммунокомпетентных клеток может изменять их биологическую активность. Возможно, увеличение в крови стельных коров уровня IgG связано также с выполнением им роли антител, участвующих в угнетении иммунного ответа в организме матери на антигены плода.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными по количественной характеристике иммуноглобулинов в сыворотке крови стельных коров (4,5). Количество иммуноглобулинов в сыворотке крови снижается только за 3 недели до отела. Именно в этот период колостральный синтез Ig в молочной железе достигает своего максимального значения (3).

В оценке функциональных возможностей иммунной системы играют важную роль корреляционные взаимосвязи (6). Положительная корреляция уровней ранних (IgM) и поздних (IgG) иммуноглобулинов, является критерием нормального функционирования иммунной системы и ее адаптивных возможностей при различных физиологических состояниях, в том числе при беременности.

Как видно из табл. 2, корреляционные взаимосвязи между различными изотипами иммуноглобулинов в сыворотке крови не стельных коров являются слабо по-

ложительными (r=0,3-0,5). Низкая степень сопряженности между показателями IgG и IgA косвенно подтверждает относительную независимость системного и местного иммунитета. При исследовании в динамике, смена слабых корреляционных взаимосвязей на сильные свидетельствует о возрастании функциональной активности иммунокомпетентных клеток (r=0,34 → r=0,74) и, соответственно, уровня иммуноглобулинов (табл. 2).

Повышение степени сопряженности между показателями иммунной системы у коров 5-6 мес. стельности свидетельствует о большем функциональном напряжении иммунной системы у стельных коров по сравнению с контрольной группой.

**Выводы**

1. Установлено, что в периферической крови коров лимфоциты, несущие на своей поверхности IgM составляют 25,3%-26,2%, а в период 5-6 мес. стельности их количество возрастает до 29,2%.

2. Показано увеличение количества розеткообразующих клеток и уровня IgG в сыворотке крови коров второй половины стельности по сравнению с их уровнем у коров со сроком стельности 3-4 мес.

3. Смена слабых корреляционных взаимосвязей между иммунологическими параметрами на сильные свидетельствует о возрастании функционального напряжения иммунной системы в период стельности у коров.

**РЕЗЮМЕ.**
**В статье представлены результаты исследований уровня иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулинов в сыворотке крови стельных коров. Для определения В-клеток был использован иммунофлуоресцентный метод. Показано, что в период стельности увеличиваются показатели клеточного и гуморального иммунитета у коров.**

**SUMMARY**
**Results of testing blood serum of the cows for a determination of immunological parameters are presented. An immunofluorescent method was used to the determination of B-cells. These data indicate increase levels E-rosette forming cells, B-lymphocytes and Ig in a maternal circulation during prenatal period in cows.**

Литература

1. Ломунова М.А., Талаев В.Ю. Клетки трофобласта плаценты человека: пути их созревания и взаимодействие с иммунной системой //Иммунология, 2007,№1, с.50-58
2. Ездакова И.Ю., Субботин В.В. Изучение иммунного статуса лабораторных мышей под влиянием пробиотиков // Материалы Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Щелково,2006 г., с.182-187
3. Salmon H. The mammary gland and neonate mucosal immunity Vet.Immunology and Immunopathology, 1999, 72, 143-155
4. Шульга Н.Н. Динамика иммуноглобулинов в сыворотках крови и молозива коров //Ветеринария, 2006, №1, 45-47
5. Шахов А.Г., Масьянов Ю.Н., Бригадиров Ю.Н. и др. Применение иммуномодуляторов при вакцинации животных против сальмонеллеза //Ветеринария, 2006,№6, с.21-26
6. Михайленко А.А. Корреляционные взаимосвязи при оценке функционирования иммунной системы //Иммунология,2000, № ,с. 59-61

**Ю.И. Филиппов, О.В. Серова**
*(ФГОУ ВПО МАВМиБ им. К.И.Скрябина)*

# РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ РОНКОЛЕЙКИНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПЕРИАНАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ У СОБАК

Целью применения Ронколейкина было изучение влияния препарата на новообразования перианальной области, послеоперационные осложнения, возможное появление рецидивов, гематологическую картину у собак.

Все составляющие современного комплексного лечения онкологических заболеваний оказываются факторами, индуцирующими иммуносупрессию по клеточному типу. Оперативное вмешательство, лучевая или химиотерапия, практически, любая другая терапия новообразований является фактором снижения иммунитета. Иммунотерапию при онкологических процессах применяют со следующими целями: активация лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, нормализация баланса цитокинов в микроокружении опухоли и самой иммунной системе, преодоление толеран-